



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0131380
(43) 공개일자 2023년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/10 (2022.01) A23L 13/20 (2016.01)
A23L 17/00 (2016.01) A23L 17/20 (2016.01)
A23L 33/12 (2016.01) A23L 33/15 (2016.01)
A61K 35/60 (2015.01) A61K 8/98 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2022.01)
A23L 13/20 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2022-0028129

(22) 출원일자 2022년03월04일

심사청구일자 2022년03월04일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

전병수

부산 해운대구 반여로 67

이승찬

부산 사하구 장림번영로104번길 10

박진석

부산 사하구 사하로 80

(74) 대리인

김중석

전체 청구항 수 : 총 15 항

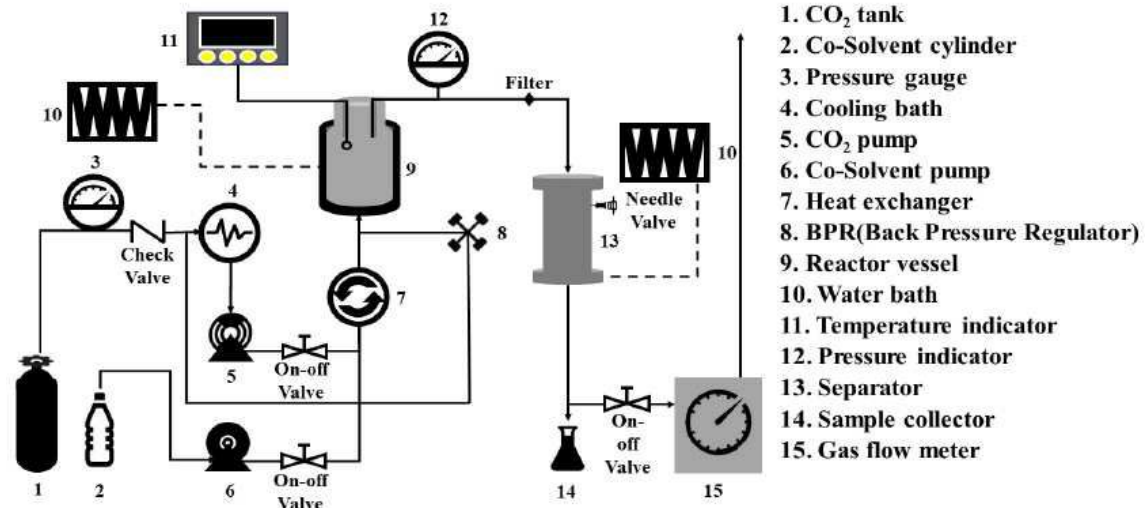
(54) 발명의 명칭 대구 초임계 추출물을 포함하는 항암, 항산화 또는 항균 조성물

(57) 요약

본 발명은 대구 초임계 추출물을 포함하는 항암, 항산화, 또는 항균 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 대구(Cod, *Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 암 질환 예방 또는 개선용, 항산화용 또는 항균용 건강기능식품, 약학 또는 화장품 조성물을 제공한다.

상기의 친환경적인 초임계 이산화탄소 추출 기술을 이용하여 다양한 기능성 물질 및 활성을 가진 초임계 추출물을 제조할 수 있고, 종래의 추출 방법보다 유독성 중금속 함량을 현저히 감소시킬 수 있어, 보다 안전하고 기능적으로 우수한 대구 또는 이의 부산물의 추출물을 제공할 수 있으며, 이를 항암, 항산화 또는 항균용 건강기능식품, 화장품 및 약학 조성물로 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 17/00 (2016.08)
A23L 17/20 (2016.08)
A23L 33/12 (2016.08)
A23L 33/15 (2016.08)
A61K 35/60 (2013.01)
A61K 8/987 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대구(Cod, *Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 암 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 대구 부산물은,

대구의 간, 내장, 껍질, 근육, 또는 뼈에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은,

40 내지 60℃의 온도 및 15 내지 30MPa 압력에서, 1 내지 5 mL/min 유량의 초임계 이산화탄소를 용매로 하여 추출된 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은,

스쿠알렌, 비타민 A, 비타민 D, 비타민 K, 또는 오메가-3 PUFA(polyunsaturated fatty acid)에서 선택되는 하나 이상을 함유하는 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은,

중금속 함량이 감소된 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 암 질환은,

위선암(adenocarcinoma), 림프종(lymphoma), 간질성 종양(gastrointestinal tumor), 육종(sarcoma) 또는 신경 내분비암(neuroendocrine tumor)에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

청구항 7

대구(Cod, *Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

대구(Cod, *Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 항산화용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

대구(Cod, *Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 항산화용 화장품 조성물.

청구항 10

대구(Cod, *Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 향균용 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 조성물은,

대장균(*Escherichia coli*) 또는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)에 대해 항균 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는, 향균용 조성물.

청구항 12

대구(Cod, *Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물을 초임계 이산화탄소로 추출하여 추출물을 수득하는 단계;를 포함하는, 대구 또는 이의 부산물의 초임계 추출물 제조방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 초임계 이산화탄소 추출은,

40 내지 60℃의 온도 및 15 내지 30MPa 압력에서, 1 내지 5 mL/min 유량의 초임계 이산화탄소를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 14

제 12 항에 있어서,

상기 수득된 추출물은,

스쿠알렌, 비타민 A, 비타민 D, 비타민 K, 또는 오메가-3 PUFA(polyunsaturated fatty acid)에서 선택되는 하나 이상을 함유하는 오일인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 15

제 12 항에 있어서,

상기 제조방법은,

상기 수득된 추출물 내 중금속 함량을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

발명의 설명**기술 분야**

- [0001] 본 발명은 대구 초임계 추출물을 포함하는 향암, 항산화, 또는 항균 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 대구(Cod, *Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물을 초임계 이산화탄소로 추출한 추출물의 향암, 항산화, 또는 항균 활성을 이용한 건강기능식품, 화장품, 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 해양 생물 활성 화합물은 고도불포화 지방산, 지용성 비타민 및 기타 생리활성 성분의 풍부한 함량으로 인한 기능적 특성으로 인해 상당한 주목을 받고 있다. 특히, 어유(fish oil)는 오메가-3 지방산 및 친유성 생리활성 화합물의 공급원으로 수요가 매우 높다. 이러한 기능성 오일은 어류 준비과정에서 버려지는 내장 부분을 포함한 다양한 어류 가공 폐기물 및 부산물에서 회수된다.
- [0004] 대구(Cod, *Gadus macrocephalus*)는 전 세계적으로 널리 소비되는 어종이며, 대구 간은 내장 폐기물의 많은 부분을 차지한다. 스쿠알렌(squalene)과 같은 기능성 성분의 공급원으로 대구 간을 활용하는 것은 상당한 경제적 기회를 구성하며, 수산 자원 가치화 및 가치 있는 성분으로의 전환에 대한 훌륭한 접근이다.
- [0005] 해양 자원으로부터 건강한 지질을 회수하기 위하여 다양한 추출 기술이 사용되고 있다. 수동 압착 또는 헥산과 같은 유기 용매를 이용한 용매 추출과 같은 종래의 추출 방법이 포함되나, 이러한 방법은 몇 가지 단점이 있다. 수동 압착(manual pressing)은 중금속 및 유기물과 같은 원치 않는 물질을 포함하는 원유의 낮은 수율 및 회수를 초래한다. 용매 추출(solvent extraction)은 심각한 환경 및 안전 문제를 야기하는 독성 및 가연성 용매의 축적 및 폐기와 관련이 있다. 또한, 이러한 종래의 방법으로 추출한 오일을 용매로부터 분리하기 위해서는 오일을 가혹한 처리 조건에 노출시키게 됨에 따라, 품질에 영향을 주며 처리에 추가 비용이 발생하게 된다.
- [0006] 이러한 종래의 독성 용매 처리에 따른 환경오염에 대한 세계적인 우려로 인해 대체 녹색 추출 기술이 추출 및 자원 가치평가 산업에서 더욱 주목받고 있다. 게다가, 일부 녹색 용매는 기존 용매로 얻은 것과 비교하여 고품질 제품을 생성하므로 이를 추출에 사용하는 것이 소비자의 안전에 중요하다. 이에, 어류 부산물로부터 다양한 생리활성 물질을 추출할 수 있는 녹색 추출 기술의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌**특허문헌**

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2010-0038029호 (2010년04월12일 공개)

발명의 내용**해결하려는 과제**

- [0009] 본 발명의 목적은 우수한 향암, 항산화, 또는 항균 활성을 가지는 어류 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은, 상기 어류 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 제조하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 대구(Cod, *Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 암 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 대구 부산물은, 대구의 간, 내장, 껍질, 근육, 또는 뼈에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0014] 상기 추출물은, 40 내지 60℃의 온도 및 15 내지 30MPa 압력에서, 1 내지 5 mL/min 유량의 초임계 이산화탄소를 용매로하여 추출된 것으로, 스쿠알렌, 비타민 A, 비타민 D, 비타민 K, 또는 오메가-3 PUFA(polyunsaturated fatty acid)에서 선택되는 하나 이상을 함유할 수 있으며, 중금속 함량이 감소된 것일 수 있다.

[0015] 상기 암 질환은, 위선암(adenocarcinoma), 림프종(lymphoma), 간질성 종양(gastrointestinal tumor), 육종(sarcoma) 또는 신경내분비암(neuroendocrine tumor)에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 대구 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 대구 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 항산화용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 대구 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 항산화용 화장품 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 대구 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 향균용 조성물을 제공한다.

[0020] 상기 조성물은, 대장균(*Escherichia coli*) 또는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)에 대해 항균 활성을 나타낼 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 대구 또는 이의 부산물을 초임계 이산화탄소로 추출하여 추출물을 수득하는 단계;를 포함하는, 대구 또는 이의 부산물의 초임계 추출물 제조방법을 제공한다.

[0022] 상기 초임계 이산화탄소 추출은, 40 내지 60℃의 온도 및 15 내지 30MPa 압력에서, 1 내지 5 mL/min 유량의 초임계 이산화탄소를 이용하여 수행될 수 있다.

[0023] 상기 수득된 추출물은, 스쿠알렌, 비타민 A, 비타민 D, 비타민 K, 또는 오메가-3 PUFA(polyunsaturated fatty acid)에서 선택되는 하나 이상을 함유하는 오일일 수 있다..

[0024] 상기 제조방법은, 상기 수득된 추출물 내 중금속 함량을 감소시킬 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따른 초임계 이산화탄소(supercritical carbon dioxide, SC-CO₂) 추출은 비-극성 화합물 추출에 적합한 친환경 기술로, 이를 이용하여 대구 또는 이의 부산물로부터 다양한 기능성 물질 및 활성을 가진 초임계 추출물을 제조할 수 있고, 특히, 상기의 기능성 물질이 다량 함유될 수 있는 최적 추출 조건을 확인함으로써, 보다 우수한 기능성을 가진 초임계 추출물을 제공할 수 있다.

[0027] 더불어, 상기 초임계 추출 방법을 이용함으로써 종래의 추출 방법보다 유독성 중금속 함량을 현저히 감소시킬 수 있어, 보다 안전하고 기능적으로 우수한 대구 또는 이의 부산물의 추출물을 제공할 수 있으며, 이를 항암, 항산화 또는 향균용 건강기능식품, 화장품 및 약학 조성물로 활용할 수 있다.

[0028]

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 오일 회수에 사용되는 실험실 규모 초임계 이산화탄소(SC-CO₂) 추출 장치의

개략도이다.

도 2는 본 발명의 일 실험예에 따른 오일 수율에 대한 독립 변수의 영향을 나타내는 3차원 응답 표면 플롯 및 등고선 플롯으로, 각각 최적 조건에서의 (a) 온도, (b) 압력, (c) 유량, 및 (d) 시간 의존적 수율 곡선을 나타낸다.

도 3은 다양한 추출 방식에 따른 대구 간유의 색상을 분석한 것으로, (a)는 수동 압착 추출 방법으로 추출된 대구 간유(CCO), (b)는 헥산 추출 방법으로 추출된 대구 간유(HCO), 및 (c)는 초임계 이산화탄소 추출 방법으로 추출된 대구 간유(SCO)를 나타낸 것이다.

도 4는 동결 건조된 대구 간 샘플 및 다양한 추출 방식에 따른 대구 간유에 함유된 중금속 농도로, (a)는 수은(Hg), (b)는 비소(As) 및 (c)는 카드뮴(Cd)을 나타내며, 다른 문자는 유의한 차이를 나타낸다 ($p < 0.05$).

도 5는 다양한 추출 방식에 따라 수득된 대구 간유의 열적 특성에 관한 것으로, (a)는 열중량 분석(TGA), (b)는 파생 열중량 분석(DTG), 및 (c)는 FT-IR 분석에 의한 스쿠알렌 및 오일의 적외선 흡수 특징을 나타낸다.

도 6은 다양한 추출 방식에 따라 수득된 대구 간유의 항산화 활성 및 세포 생존을 분석에 관한 것으로, (a)는 DPPH 분석 그래프, (b)는 ABTS⁺ 분석 그래프, (c)는 FRAP 분석 그래프, 및 (D)는 인간 위 선암종 세포주(AGS)의 생존율을 나타낸 그래프이며, 다른 문자는 유의한 차이를 나타내고 ($P < 0.05$), 다른 유의 수준에서 * 및 **는 각각 $p < 0.05$ 및 $p < 0.001$ 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030]

이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.

[0032]

본 발명자는 친환경적인 초임계 이산화탄소(supercritical carbon dioxide, SC-CO₂)를 이용한 대구 부산물의 추출 방법 및 최적 조건을 확립하였고, 이러한 초임계 추출물이 기존의 헥산 및 압착 방법에 따른 추출물과 비교하여 기능성 물질의 높은 함량과 더불어 가장 낮은 독성 중금속 함량을 가지며, 우수한 항암, 항산화 및 항균 활성을 나타냄을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0034]

본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0035]

명세서 전체에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있음을 의미한다.

[0037]

본 발명은 대구(Cod, *Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 암 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0038]

본 명세서에서, "대구(Cod, *Gadus macrocephalus*)"는 대구목 대구과에 속하는 바닷물고기로, 머리가 크고 입이 커서 '대구' 또는 '대구어'라고 불린다. 생김새는 명태와 비슷하지만 몸 앞쪽이 보다 두툼하고 뒤쪽은 점점 납작해지며, 눈과 입이 크고 위턱이 아래턱에 비해 앞으로 튀어나와 있다. 뒷지느러미는 두 개로 겹고, 등지느러미는 세 개로 넓게 퍼져있으며 가슴지느러미와 함께 노란색을 띤다. 크기는 태어난 지 2~3살 경에 50 cm 정도가 되고, 더 자라면 1 m 정도로 자라기도 하며, 몸무게도 많이 나가는 편이어서 지금까지 가장 무거운 경우 22.7kg로 보고되었다.

[0039]

상기 대구 부산물은 대구의 간, 내장, 껍질, 근육, 또는 뼈에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 대구의 간 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041]

본 명세서에서, "추출물"이란, 추출 방법, 추출 용매, 추출된 성분 또는 추출물의 형태를 불문하고 천연물의 성

분을 뽑아냄으로써 얻어진 물질을 의미하는 것으로, 천연물의 성분을 뽑아내어 얻어진 물질을 추출 후 다른 방법으로 가공 또는 처리하여 얻어질 수 있는 물질을 모두 포함할 수 있다.

- [0042] 상기 추출물은 초임계 유체 추출 방법에 따라 추출될 수 있고, 바람직하게는 초임계 이산화탄소 추출 방법에 따라 추출될 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등과 병용하여 수행될 수 있다.
- [0043] 초임계 이산화탄소(supercritical carbon dioxide, SC-CO₂) 추출은 비-극성 화합물 추출에 적합한 친환경 기술로, CO₂ 초임계 상태 (TC = 31℃)에 도달하기 위해 필요한 낮은 임계 온도로 인해 열에 불안정한 생리활성 성분 분해에 대한 걱정 없이 쉽게 추출할 수 있고, 이 후 CO₂를 쉽게 분리하여 깨끗하고 안전한 추출물의 사용을 가능하게 한다.
- [0044] 바람직하게는, 상기 추출물은 초임계 이산화탄소로 추출된 대구 부산물의 오일(oil)일 수 있고, 보다 바람직하게는 대구 간유일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 바람직하게는, 상기 추출물은 40 내지 60℃, 보다 바람직하게는 45 내지 55℃의 온도; 및 15 내지 30MPa, 보다 바람직하게는 25 내지 30MPa의 압력;에서, 1 내지 5 mL/min, 보다 바람직하게는 3 내지 5 mL/min 유량의 초임계 이산화탄소를 용매로 하여 추출될 수 있다. 후술되는 실험예에 따르면, 상기 조건일 때, 초임계 추출된 오일의 수율과 화학적 조성, 안정성, 열안정성 및 생물학적 특성이 우수함을 확인할 수 있다.
- [0046] 상기 추출물은 다양한 기능성 물질을 함유할 수 있고, 바람직하게는 스쿠알렌(squalene), 비타민 A, 비타민 D, 비타민 K, 또는 오메가-3 PUFA(polyunsaturated fatty acid)에서 선택되는 하나 이상을 함유할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 더불어, 상기 추출물은 독성 중금속 함량이 현저히 감소될 수 있고, 암 세포에 대해 우수한 세포 독성을 가지는 바, 암 질환 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품 조성물로 활용될 수 있다.
- [0049] 상기 암 질환은 위선암(adenocarcinoma), 림프종(lymphoma), 위의 간질세포에서 발생하는 간질성 종양(gastrointestinal tumor), 비상피성 세포에서 유래하는 악성 종양인 육종(sarcoma), 및 호르몬을 분비하는 신경내분비암(neuroendocrine tumor)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 위선암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 명세서에서, "건강기능식품"이란, 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품으로, 영양 공급 외에도 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미하며 기능성 식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용할 수 있다. 예를 들어, 건강보조식품, 특수 영양 보충용 식품, 기능성 음료 등으로 제조될 수 있고, 또는 천연식품, 가공식품 등에 본 발명에 따른 조성물이 첨가될 수 있다.
- [0052] 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료 등으로 제조될 수 있고, 상기 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 음료 및 각종 드링크, 과일 및 그의 가공식품(과일통조림, 잼 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(햄, 베이컨 등), 빵류 및 면류, 쿠키 및 스낵류, 유제품(버터, 치즈 등) 등이 가능하며, 통상적인 의미에서의 기능성 식품을 모두 포함할 수 있다. 또한, 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 건강기능식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 식품학적으로 허용 가능한 식품 첨가제 및 적절한 기타 보조 성분을 더 포함하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 향미제, 천연 탄수화물, 감미제, 비타민, 전해질, 착색제, 펙트산, 알긴산, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 특히, 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜을 사용할 수 있으며, 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 식품 첨가제 및 기타 보조 성분 등은 그것이 첨가되는 용도를 달성할 수 있는 한 극미량으로 첨가되어 사용되는 것이 바람직하다. 극미량이란 수치적으로 표현할 때 건강기능식품 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.0005 중량% 내지 약 0.5 중량% 범위일 수

있다.

- [0054] 상기 건강기능식품 조성물은 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 암 질환 예방, 또는 개선을 위한 보조제로 섭취될 수 있다.
- [0056] 본 발명은 대구(*Cod, Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0057] 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.
- [0059] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 약학 조성물은 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 적절한 담체와 배합될 수 있고, 필요에 따라, 부형제, 희석제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 결합제, 붕해제, 용제 등을 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 적절한 담체 등은 본 발명에 따른 추출물의 활성 및 특성을 저해하지 않는 것으로, 투여 형태 및 제형에 따라 달리 선택될 수 있다.
- [0060] 상기 약학 조성물은 어떠한 제형으로도 적용될 수 있고, 보다 상세하게는 통상의 방법에 따라 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0061] 상기 경구형 제형 중 고형 제형은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 형태로, 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 솔비톨, 만니톨, 셀룰로오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있고, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 포함될 수 있다. 또한, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0062] 상기 경구형 제형 중 액상 제형은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0063] 상기 비경구 제형은 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 이에 제한되지 않고, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.
- [0064] 또한, 상기 약학 조성물은 치료 효능의 증진을 위해 칼슘이나 비타민 등을 더 첨가할 수 있다.
- [0066] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.
- [0067] 본 명세서에서, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다.
- [0068] 상기 약학 조성물의 유효 용량 수준은 사용 목적, 환자의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 달리 결정될 수 있다. 예를 들어, 일정하지는 않지만 일반적으로 0.001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여될 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0069] 상기 약학 조성물은 암 질환이 발생할 수 있는 임의의 동물에 투여할 수 있고, 상기 동물은 예를 들어, 인간 및 영장류뿐만 아니라 소, 돼지, 말, 개 등의 가축 등을 포함할 수 있다.
- [0070] 상기 약학 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여 경로로 투여될 수 있고, 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 투여 방법은 특히 한정할 필요 없이, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피부 도포, 호흡기내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 등의 통상적인 방법으로 투여될 수 있다.
- [0071] 본 발명에 따른 약학 조성물은 암 질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용될 수 있고, 수술 또는 다른

약물 치료 등과 병용하여 사용될 수 있다.

- [0073] 본 발명은 대구(*Cod, Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 항산화용 건강기능식품을 제공한다.
- [0074] 또는, 본 발명은 대구(*Cod, Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 항산화용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0075] 상기 추출물은 우수한 항산화 활성을 가지는 바, 이를 건강기능식품 조성물 또는 화장품 조성물로 활용할 수 있다.
- [0076] 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.
- [0078] 본 명세서에서, "화장료"란, 피부 노화 등의 예방 또는 개선의 효과를 가지는 기능성 화장료를 포함할 수 있으며, 상기 기능성 화장료는 일반 화장료와 달리 생리활성적인 효능, 효과가 강조된 전문적인 기능성을 갖는 화장료를 의미한다.
- [0079] 상기 화장료 조성물은 식품의약품안전처에 등록된 화장품 원료 리스트 및 ICID(국제화장품 원료집)에 등재되어 있는 성분 중에서 1종 이상을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 화장료 조성물은 유기 용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 방향제, 계면활성제, 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제, 방부제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 염료 및 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 하나 이상 더 포함할 수 있다.
- [0080] 상기 화장료 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있다. 예를 들어, 화장수, 유액, 로션, 크림, 페이스트, 젤, 용액, 현탁액, 오일, 왁스, 팩, 파우더, 파운데이션, 스프레이, 계면활성제-함유 클렌징 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 더욱 상세하게는, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 영양 크림, 마사지 크림, 밀크로션, 파우더, 에센스, 아이 크림, 선로션, 선크림, 메이크업 프라이머, 메이크업 베이스, 비비크림, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징 워터, 비누, 팩, 스틱상 제품, 밤(Balm) 타입 제품, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0081] 상기 화장료 조성물은 단독 또는 중복으로 도포하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 화장료 조성물과 중복 도포하여 사용할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.
- [0083] 본 발명은 대구(*Cod, Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는, 항균용 조성물을 제공한다.
- [0084] 상기 추출물은 그람 음성균 또는 그람 양성균에 대해 항균 활성을 가질 수 있고, 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*) 또는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)에 대해 항균 활성을 가질 수 있는 바, 이를 항균용 식품 첨가제 조성물, 의약 조성물, 또는 의약외품 조성물 등으로 활용할 수 있다.
- [0085] 더불어, 대장균(*E. coli*) 또는 바실러스 세레우스(*B. cereus*)에 의해 발생하는 감염 질환을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 의약 조성물 또는 건강기능식품 조성물로 활용할 수 있다.
- [0087] 또한, 본 발명은 대구(*Cod, Gadus macrocephalus*) 또는 이의 부산물을 초임계 이산화탄소로 추출하여 추출물을 수득하는 단계;를 포함하는, 대구 또는 이의 부산물의 초임계 추출물 제조방법을 제공한다.
- [0088] 상기 초임계 이산화탄소 추출은, 40 내지 60℃, 보다 바람직하게는 45 내지 55℃의 온도; 및 15 내지 30MPa, 보다 바람직하게는 25 내지 30MPa의 압력;에서, 1 내지 5 mL/min, 보다 바람직하게는 3 내지 5 mL/min 유량의 초임계 이산화탄소를 이용하여 수행될 수 있다.

[0089] 상기 초임계 이산화탄소 추출에 의해 수득된 추출물은 스쿠알렌, 비타민 A, 비타민 D, 비타민 K, 또는 오메가-3 PUFA(polyunsaturated fatty acid)에서 선택되는 하나 이상을 함유하는 오일일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0090] 상기 제조방법은, 상기 수득된 추출물 내 중금속 함량을 감소시킬 수 있어, 안전한 추출물을 제공할 수 있다.

[0092] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0094] <실시예 1> 대구 간유의 추출

[0095] 1. 실험 물질 및 시약

[0096] 대구 간(Cod liver)을 대한민국 거제도 외포항에서 구매하여 72시간 동안 동결 건조한 후, 실험에 사용할 때까지 -70℃에서 보관하였다. 추출에 사용된 CO₂는 KOSEM (Sahagu, Korea; 99.5% pure)로 부터 구매하였다. 다른 시약 및 표준물질은 분석 또는 HPLC 등급이었다.

[0097] 박테리아 균주 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) (그램-양성) 및 대장균(*Escherichia coli*) (그램-음성)은 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 입수하여 한천 사면(agar slant) 배지에서 배양하였다. 위암 세포주 AGS 세포주는 미국형배양물보관소 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하였다.

[0099] 2. 대구 간유(Cod liver oil, CLO) 추출

[0100] 2-1. 기존 방법의 추출

[0101] 대구 간유(CLO)는 100g 대구 간과 2L 헥산(hexane)을 혼합한 헥산으로 통상적으로 추출되었다. 혼합물은 마그네틱 스티러(stirrer)를 이용하여 40℃에서 24시간 동안 교반한 후 여과하였고, 진공 농축기를 이용하여 오일로부터 헥산을 분리하였다. 오일 수율은 백분율(percentage, %)로 표시하였다 (HCO).

[0102] 수동 압착(manual pressing) 추출은 30g의 대구 간을 수동 압착기 (Newtech, P00000GZ)를 사용하여 압축하고, 회수된 오일의 양을 수율의 %로 표시하였다 (CCO).

[0104] 2-2. 초임계 이산화탄소(supercritical carbon dioxide, SC-CO₂) 추출

[0105] 반응 표면 분석법(response surface methodology, RSM) Box-Behnken 설계 (Box-Behnken Design, BBD)를 이용하여 SC-CO₂ 추출 압력, 온도, 및 CO₂ 유량(flow rate) 조건을 최적화하였다.

[0106] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 오일 회수에 사용되는 실험실 규모 SC-CO₂ 장치의 개략도이다. 이 시스템은 CO₂ 공급 탱크, 압축된 CO₂를 액체 CO₂로 응축시키는 냉각기, 추출 용기의 온도를 제어하는 열교환기, 및 분리기가 장착되어 있다. 분리기에는 CO₂ 흐름을 제어하는 니들 밸브가 장착되어 있다. 가스 유량계는 추출 과정에서 CO₂의 소비량을 측정하는 데 사용되었다. 오일 수율은 하기 식 1에 따라 회수된 오일의 백분율로 표시되었다.

[0107] <식 1>

$$Oil\ yield\ (\%) = \frac{m}{M} * 100$$

[0108]

[0109] 여기서, m은 오일의 질량(g), M은 추출에 사용된 건조 대구 간의 질량이다.

[0111] 이하, 하기 실험들은 세 번 수행되었으며, 그 값은 평균 $\pm$ 표준편차로 표시되었다. 일원 분산분석(One-way ANOVA)은 SPSS software (version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL)를 사용하여 수행되었다. 평균값과의 차이의 통계적 유의성은 Duncan 다중 범위 테스트(Duncan's multiple range tests)로 결정되었다. 유의 수준은 $p < 0.05$ (항암 활성의 경우, $p < 0.001$)에 도달하였다.

[0113] <실험예 1> SC-CO₂ 추출 최적화

[0114] 실험은 SC-CO₂ 추출을 구동하는 독립 변수로 설정된 주요 공정 매개변수의 상호 작용 효과를 결정하기 위해 Box-Behnken 설계(BBD)에 따라 수행되었다.

[0115] 온도 (A; °C), 압력 (B; MPa), 및 CO₂ 유량 (C; mL/min)을 SC-CO₂ 추출에 영향을 미치는 주요 요인으로 선택하였다. 오일 수율 (y; %)은 대구 간으로부터 오일 회수를 최대화하기 위한 모니터링된 반응이었다. 각 매개변수의 수준은 이전에 발표된 해양 자원의 오일 추출 및 예비 스크리닝 실험에 따라 설정되었다. 각 코딩된 변수의 범위는 -1에서 +1이고, 최대 및 최소 범위는 일반적으로 사용되는 하기 식 2에 따라 설정되었다.

[0116] <식 2>

$$X = \frac{x - [x_{max} + x_{min}]/2}{[x_{max} - x_{min}]/2}$$

[0117]

[0118] 여기서, x는 자연 변수, X는 코딩된 변수, 및 x_{max} 및 x_{min} 은 자연 변수의 최대 및 최소값이다.

[0119] 마지막으로, 추출 수율에 영향을 미치는 독립 변수, 즉, 온도, 압력, 및 CO₂ 유량은 각각 40°C, 15MPa, 및 1 ml/min의 낮은 수준(-1)에서 60°C, 30MPa, 및 5 ml/min의 높은 수준(+1)의 범위로 하였다.

[0121] 총 17개의 실험이 5개의 중심 반복을 포함하는 무작위 조합에서 획득되었다. 오일 수율에서 상기 독립 변수의 영향을 하기 표 1에 표시된 대로 평가하였다.

[0122] 하기 표 1은 온도(A), 압력(B), 및 CO₂ 유량(C)에 대한 서로 다른 독립 매개변수를 결합한 Box-Behnken 실험 설계로, 17번의 실험 조건 및 이 때의 오일 수율을 나타낸 것이다.

표 1

Run	A (°C)	B (MPa)	C (mL/min)	Actual Yield (%)	Predicted Yield (%)
1	60	22.5	5.00	9.346	9.370
2	40	30.0	3.00	11.380	10.330
3	50	15.0	5.00	3.230	2.160
4	50	30.0	1.00	3.315	4.390
5	50	22.5	3.00	7.503	6.670
6	50	22.5	3.00	7.201	6.670
7	50	15.0	1.00	0.432	0.240
8	60	15.0	3.00	0.585	1.640
9	40	22.5	1.00	1.293	1.27
10	50	30.0	5.00	15.863	16.54
11	60	30.0	3.00	13.920	13.220
12	60	22.5	1.00	1.848	1.470
13	50	22.5	3.00	5.811	6.670
14	40	22.5	5.00	7.544	7.920
15	50	22.5	3.00	7.287	6.670
16	40	15.0	3.00	2.197	2.890
17	50	22.5	3.00	5.563	6.670

[0123]

[0125]

실험 결과는 하기 식 3에 설명된 2차 다항식 모델에 적합하여 오일 수율에서 독립 변수의 다양한 영향을 예측하였다. 분산 분석(analysis of variance, ANOVA)을 사용하여 방정식의 각 항에 대한 통계적 유의성, 적합성 결여 및 회귀 계수를 평가하여 모델을 검증하였다.

[0126]

<식 3>

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=0}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=0}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum_{i < j}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

[0127]

[0128]

여기서, Y는 응답 변수를 나타내고, X_i 및 X_j 는 응답에 영향을 미치는 독립 변수이며, β_0 , β_i , β_{ii} , 및 β_{ij} 는 intercept, linear, quadratic, 및 interaction 항에 대한 계수를 나타낸다.

[0130]

SC-CO₂ 추출은 압력, CO₂ 유량, 및 온도에 대해 최적화되었고, 오일 수율에 대한 이들의 상호작용의 영향을 평가하기 위해, 실험 영역의 범위에서 높은, 중간, 및 낮은 수준의 조합을 나타내는 총 17개의 실험을 수행한 결과, 오일 수율에 대한 매개변수의 효과가 상기 표 1과 같이 나타났다.

[0131]

상기 표 1을 참조하면, 최저 오일 수율 및 최고 오일 수율은 각각 약 0.43% 및 15.86%였으며, 이는 압력 및 CO₂ 유량의 결합된 효과와 관련이 있는 것으로 나타났다. 실제로, 최저 압력 (15 MPa) 및 CO₂ 유량 (1 mL/min)은 예측된 반응 및 실제 반응 모두에서 최저 오일 수율과 상관관계가 있었다. 대조적으로, 최고 압력 (30 MPa) 및 CO₂ 유량 (5 mL/min)은 최고 오일 수율과 관련이 있었다.

[0133] 모델을 예측하고 검증하기 위하여, 다중 회귀 분석을 수행하였다. 변수들의 상호작용 및 프로세스에 대한 매개 변수의 모델 예측 가능성에 대한 그들의 영향을 나타내는 하기 식 4의 2차 다항식 방정식은 변동 계수 분석에 의해 평가되었다.

[0134] <식 4>

$$Y = 10.72047 - 0.13973A - 0.096550B - 0.38537C + 1.38400 \times 10^{-4}AB \\ + 155.87 \times 10^{-4}AC + 162.250 \times 10^{-4}BC - 1.77375 \times 10^{-3}A^2 \\ + 9.33111 \times 10^{-5}B^2 - 371.97 \times 10^{-3}C^2$$

[0135]

[0137] 모델, 개별 변수 및 상호작용 변수의 통계학적 유의성은 ANOVA로 분석되었다.

[0138] 하기 표 2는 ANOVA의 모델 응답, 피팅 매개변수 및 회귀 계수를 나타낸 것이다.

표 2

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	326.84	9	36.32	25.36	0.0002	significant
A-Temperature	1.35	1	1.35	0.94	0.3641	
B-Pressure	180.82	1	180.82	126.29	< 0.0001	
C-Flow rate	105.81	1	105.81	73.91	< 0.0001	
AB	4.31	1	4.31	3.01	0.1263	
AC	0.39	1	0.39	0.27	0.6184	
BC	23.77	1	23.77	16.60	0.0047	
A ²	0.13	1	0.13	0.093	0.7698	
B ²	1.16	1	1.16	0.81	0.3980	
C ²	9.32	1	9.32	6.51	0.0380	
Residual	10.02	7	1.43			
Lack of Fit	6.70	3	2.23	2.69	0.1814	not significant
Pure Error	3.32	4	0.83			
Cor Total	336.86	16				

R-squared = 0.9702; Adj R-squared = 0.9320; Pred R-squared = 0.6662; Adeq precision (signal to noise ratio) = 18.287

[0139]

[0141] 상기 모델은 매우 유의미하며 ($p < 0.0002$), 이는 실험 영역의 결과를 예측하는 데 사용할 수 있음을 나타낸다. 독립 변수의 통계적 분석은 온도가 추출 수율에 유의한 영향을 미치지 않는 반면 ($p < 0.3641$), 압력 및 CO₂ 유량의 효과는 매우 유의한 것으로 나타났다 ($p < 0.0001$).

[0142] 모델은 압력 및 CO₂ 유량의 상호작용 효과가 유의한 것으로 나타났다 ($p < 0.0047$). SC-CO₂ 추출이 진행되는 동

안 압력이 증가하면, 밀도가 증가하여 SC-CO₂에서 용질의 용해도가 향상된다. CO₂ 유량의 증가는 물질 전달 특성 및 추출 수율을 향상시킬 수 있다.

[0143] 모델 정확도의 추가 검증은 변동 계수, $R^2 = 0.9702$, 조정된 $R^2 = 0.932$, 및 예측된 $R^2 = 0.666$ 와 함께 적합성이 미미한 것으로 나타났으며, 이는 모델 정확도를 지원한다. 그러므로, 모델 방정식은 시스템의 실제 거동을 정의하므로, 실험 영역의 보간(interpolation)에 사용할 수 있다.

[0145] 모델을 추가로 검증하기 위해, 도 2에 나타난 바와 같이, 3차원 등고선 플롯을 생성하여 응답에 대한 독립 변수의 상호작용 효과를 확인하였다.

[0146] 도 2(a)를 참조하면, 압력 대 온도 상호작용의 분석은 응답(% 수율)이 압력의 변화에 의한 영향을 받는 반면, 변화하는 온도는 수율에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 도 2(b)를 참조하면, 유량 대 온도의 상호작용 효과를 분석할 때도 이와 유사한 경향이 확인되었으며, 응답은 온도가 아닌, CO₂ 유량에 의존적이었다. 그러나, 도 2(c)를 참조하면, 유량 대 압력의 상호작용 분석은 두 매개변수 모두를 증가시키면 오일 수율에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다. 전반적으로, 이러한 결과는 온도 및 CO₂ 유량이 대구 간에서 오일 추출을 최대화하는 데 영향을 미치는 매개변수임을 보여준다.

[0147] 정확한 최적 추출 조건은 49°C의 온도, 29.9 MPa의 압력, 및 4.97 mL/min의 CO₂ 유량이다. 도 2(d)를 참조하면, 최적 조건의 압력, CO₂ 유량, 및 온도에서, SC-CO₂ 추출로 달성된 대구 간의 전체 수율은 추출 시간에 대한 오일 수율의 추출 곡선을 플로팅하여 결정되었다. 오일 수율은 추출 후 5시간 이내 기하급수적으로 증가하여 거의 38%에 이르렀다. 추출 수율은 추출 시간이 15시간 될 때까지 느린 속도로 추출 시간이 증가함에 따라 계속 증가하여 약 48%에 이르렀다. 이 기간 이후, 오일 회수가 정체기에 도달하면서 오일 수율 증가는 미미하였다. 20시간 후 전체 SC-CO₂ 추출된 오일 수율은 약 50% 였다. 다른 추출 기술과 비교하여 수동 압착(CCO), 헥산 추출(HCO) 수율은 각각 $31.32 \pm 4.61\%$ 및 $55.72 \pm 2.61\%$ 이었다.

[0149] <실험예 2> 일반 성분(Proximate composition) 분석

[0150] 오일 일반 성분을 분석하기 위하여, AOAC 방법 (1997)에 따라 조 지질(crude lipids), 조 단백질(crude proteins), 회분, 및 수분을 측정하였다. 탄수화물 함량은 전체 100에서 모든 일반 성분을 뺀으로써 계산되었다.

[0152] 그 결과, 동결 건조된 대구 간의 일반 성분은 하기 표 3에 나타난 바와 같이, 50% 이상의 조 지질 ($56.62\% \pm 2.61\%$), 상당한 수준의 수분 ($21.58\% \pm 1.01\%$) 및 단백질 ($12.91\% \pm 1.32\%$)을 포함하였다. 나머지 미량 성분은 탄수화물 및 회분 함량에 기인한다.

표 3

Compositions	Raw material (%)
Crude protein	12.91±1.32 ^c
Crude lipid	56.62±2.61 ^a
Carbohydrate	7.58±2.22 ^d
Moisture	21.58±1.01 ^b
Ash	1.31±0.22 ^e
Mean ± SD (n=3)	

Different letters indicate difference ($p<0.05$) according to Duncan's multiple range test.

[0153]

[0155]

<실험예 3> 색상 분석

[0156]

음식의 색은 중요한 감각 요소로, 오일의 색상은 지방산과 상호 작용하고 산화 과정을 가속화할 수 있는 이물질의 잠재적인 존재를 나타낸다. Lovibond RT-series machine (The Tintometer Ltd, Amesbury, UK)으로 오일 색을 평가하기 위해 열량 분석이 사용되었다. L (lightness), a* (redness), 및 b* (yellowness) 값은 CIELAB 색 공간에서 3차원 값으로 표현되었다. 표준 플레이트 값은 L = 95.08, a* = - 0.95, 및 b* = 0.02 이다.

[0158]

하기 표 4는 본 실험예에 따른 다양한 추출방법에 따라 추출된 대구 간유의 색상을 분석한 것이다.

표 4

Conditions	L	a*	b*
CCO	58.96±0.72 ^a	-4.53±0.10 ^c	27.97±0.79 ^b
HCO	32.96±0.36 ^c	9.60±0.24 ^a	5.31±0.19 ^c
SCO	48.39±0.87 ^b	8.70±0.21 ^b	29.36±0.70 ^a
Mean ± SD (n=3)			

Different letters indicate difference ($p<0.05$) according to Duncan's multiple range test.

[0159]

[0161] 상기 표 4 및 도 3을 참조하면, 적용된 추출 기술에 따라 모든 색상 지표가 유의하게 다르게 나타났다. 명도 (lightness)는 CCO 및 SCO에서 각각 58.96 ± 0.72 및 48.39 ± 0.87 의 L 값으로 더 높았고, 황색도 (yellowness)는 SCO 및 CCO 추출된 오일에서 b^* 값이 각각 29.36 ± 0.70 및 27.97 ± 0.79 로 우세하였다. HCO는 32.96 ± 0.36 의 L 값과 9.60 ± 0.24 의 가장 높은 a^* 값으로 상당히 더 어두운 색상을 나타내었다.

[0162] SC-CO₂ 추출은 비-극성 용매로 CO₂를 사용하여 높은 선택성을 가지기에 이러한 결과가 예상되었다. 그러므로, 이러한 기술로 추출된 오일은 불순물이 적고, 바람직한 황색도 및 명도 특성을 나타낸다.

[0163] 헥산으로 추출된 오일의 더 어두운 색상은 용해된 안료와, 극성 및 비극성 물질의 혼합물 때문일 수 있다. 게다가, 진공 증류에 의한 용매 제거는 열에 의한 오일 산화를 시작하여 오일 색상에 영향을 줄 수 있다.

[0165] <실험예 4> 대구 간유의 화학적 조성 확인

[0166] 대구 간유(CLO)의 조성은 UV-Vis 검출기 및 Luna 5u C18 (2) 100A (4.6 × 250 mm) 컬럼이 장착된 HPLC instrument (JASCO HPLC system, Tokyo, Japan) 를 사용하여 이전에 설명된대로 분석되었다 (Bavisetty & Narayan, 2015).

[0167] 주입 용량은 10 μL 이고, 오일-클로로포름 혼합물의 분취량은 HPLC 주입 전 시린지에 여과되었다. 수용성 비타민 A (레티놀), D₃ (콜레칼시페놀), 및 K 뿐만 아니라 스쿠알렌의 오일 함량을 분석하였다.

[0168] 하기 표 5는 각 성분에 대한 분석 방법론, 특히 검출 파장, 오븐 온도, 이동상 조성, 및 유량 조건을 나타낸 것이다.

표 5

Parameters	Vitamin A	Vitamin D	Vitamin K	Squalene
Wavelength	325 nm	265nm	250 nm	214 nm
Oven temperature	35 °C	40 °C	40 °C	40 °C
Mobile phase	MeOH:Water (90:10, v/v)	ACN:MeOH (90:10, v/v)	MeOH:IPA (90:10, v/v)	MeOH:IPA:Acetic acid (91.95:8:0.050, v/v)
Flow rate	1.0 ml/min	1.0 ml/min	1.0 ml/min	1.0 ml/min
Column	Luna 5u C18(2) 100A (4.6 × 250 mm)			
Injection volume	10 μl			

[0169]

[0170] 각 화합물은 개별 화합물의 표준 검량선을 사용하여 정량화되었다.

[0172] 지방산 분석은 SUPELCO SPTM-2560 Fused Silica Capillary Column (100 m × 0.25 mm × 0.2 μm)이 장착된 GC-FID (Agilent Technologies, 7683B Series)를 사용하여 이전에 설명된 지방산 메틸화 공정을 거쳐 수행되었다 (Nkurunziza, Ho, Protzman, Cho, Getachew, Lee, et al., 2021).

[0174] 하기 표 6은 비타민, 스쿠알렌 및 오메가-3 PUFA(polyunsaturated fatty acid)를 포함하는 대구 간유로부터 획득한 다양한 생리 활성 성분의 농도를 나타낸 것이다.

표 6

Conditions	vitamins (μg/mL)				ω-3 PUFAs (μL/g)		
	Vit A	Vit D	Vit K		Squalene (μg/mL)	EPA	DHA
			K2	K3			
CCO	43.90±0.99 ^a	6.42±0.04 ^c	2.12±0.14 ^b	36.64±0.45 ^c	15.63±0.90 ^c	17.50±0.24 ^a	32.53±0.38 ^a
HCO	1.68±0.03 ^c	15.53±0.26 ^b	2.09±0.24 ^b	63.18±0.53 ^b	120.90±4.55 ^b	14.32±0.61 ^b	28.85±1.46 ^b
SCO	6.11±0.17 ^b	30.03±0.85 ^a	2.90±0.19 ^a	112.63±0.54 ^a	149.31±9.99 ^a	13.91±0.43 ^b	23.41±0.96 ^c
Mean ± SD (n=3)							

Different letters indicate difference (p<0.05) according to Duncan's multiple range test.

[0175]

[0176]

상기 표 6을 참조하면, 비타민 A 농도는 SCO 보다 현저하게 CCO (43.90 μg/mL)에서 유의적으로 높게 나타났고, 헥산은 비타민 A의 회수에 비효율적임을 확인하였다. 한편, SCO (30.03 μg/mL)에서 회수된 비타민 D의 양은 각각 HCO 및 CCO의 2배 및 6배 였다. 비타민 K, 특히 K2 및 K3, 및 스쿠알렌은 다른 추출 기술에서 획득된 오일보다 SCO에서 훨씬 더 풍부한 것으로 나타났다.

[0177]

SC-CO₂ 선택성 및 지용성 비타민과 스쿠알렌을 용해하는 능력은 기능성 오일을 회수하는 추출 방법으로 잠재성을 가짐을 의미한다. SC-CO₂에서 비타민 A의 낮은 용해도는 공용매(co-solvent)를 사용하여 개선될 수 있다. 또한, 대구 간유는 인간에서 수많은 기능성 특징을 나타내는 것으로 알려진 EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexaenoic acid)와 같은 ω-3 PUFA의 현저한 양을 포함하는 것으로 관찰되었다.

[0179]

<실험예 5> 중금속 확인

[0180]

유독성 중금속은 급성 및 만성 독성을 유발하기 때문에 인체에 심각한 위협이 된다. 그들은 신경 독성을 일으키고, 최소량으로도 산화 스트레스를 촉진하며, 단백질, 지질, 및 DNA 분자를 손상시키는 자유 라디칼을 생성할 수 있다.

[0181]

샘플은 550℃에서 12시간 동안 열 컨트롤러가 장착된 카볼라이트 로(carbolite furnace)에서 회화 후, 재를 모아 3% 질산 용액 10 mL에 용해시켰다. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (PERKIN ELMER NexION 300D)을 사용하여 비소(arsenic, As), 카드뮴(cadmium, Cd), 및 납(lead, Pb) 조성의 분석 전에 필터링하였다. 수은(mercury, Hg) 함량은 Automatic Mercury Analyzer (MILESTONE Tri-Cell DMA-80)을 사용하여 측정되었다.

[0183]

도 4를 참조하면, 대구 간 원료의 수은(Hg) 및 카드뮴(Cd) 함량은 추출 후 오일에서 발견된 양보다 유의하게 높은 것으로 나타났다 (p < 0.05). 그러나, 도 4(b)에서 CCO는 원료, HCO, 또는 SCO 보다 비소(As)의 농도가 더 높게 나타났다.

[0184]

SC-CO₂ 추출은 다른 추출 방식과 비교하여 중금속의 농도가 가장 낮게 나타났다. 이는 비극성 화합물의 SC-CO₂ 추출의 선택성 때문일 수 있다.

[0186]

<실험예 6> 열중량 및 FT-IR 분광 분석

[0187]

열중량 분석기 (TA Instruments Discovery DSC 25, Discovery TGA 55, TMA Q400)를 사용하여 열 안정성을 분석하였다.

[0188]

간략하게, 5 mg의 오일을 N₂ 가스 하에서 분당 10℃의 속도로 온도를 증가시키면서 50℃에서 700℃ 범위의 온도에 노출시켜 오일 중량 손실 및 열 안정성을 측정하였다. 파생 열중량 분석(derivative thermalgravimetric analysis, DTG) 결과는 열중량 분석(TGA) 결과를 미분하여 획득하였다. FT-IR spectrometer (Jasco, Inc.,

USA)를 사용하여 650 에서 4000 cm^{-1} 범위의 파장에 대해 기록된 IR 스펙트럼을 획득하였다.

[0190] 도 5를 참조하면, (a) 및 (b)의 TG 및 DTG 곡선은 다양한 추출 방식으로 수득된 대구 간유의 열분해 프로파일을 보여준다. SCO 및 HCO 중량 손실은 190℃에서 270℃로 온도가 증가함에 따라 크게 감소하여, SCO는 약 24%, 및 HCO는 약 16%로 중량 손실을 나타내었다. 그러나, 유사한 온도 조건에서 CCO는 4%의 중량 손실만이 관찰되었다. 300℃의 온도에서 분해 속도는 약 27%의 중량 손실의 SCO에서 더 빠르게 유지되었고, 반면 HCO에 대해서는 18% 중량 손실이 관찰되었다. 놀랍게도 330℃까지의 온도에 대한 분해 속도는 (a)의 TG 곡선에서 볼 수 있듯이 단 7%의 중량 손실의 CCO의 경우 현저히 느린 것으로 나타났다. 330℃ 이상의 온도에 대해 극적인 중량 손실은 추출 방식에 관계없이 모든 오일 샘플에 영향을 미쳤고, 모든 샘플은 470℃에서 완전히 분해되었다.

[0191] 대구 간유의 분해 프로파일은 추출 방식에 따른 오일 화학적 조성의 차이를 보여주었다. SCO에서 보여지는 가장 빠른 분해 속도는 비극성 지질을 선택적으로 용해시키는 비극성 용매 CO_2 를 사용한 SC- CO_2 추출에 의해 회수된 오일의 순도에 기인할 수 있다. 게다가, SC- CO_2 추출은 지방산 사슬에 의해 산소 흡착을 방지하는 폐쇄 시스템에서 수행된다. 이는 SC- CO_2 추출된 오일에서 과산화물의 형성을 피하기 때문에 유리하다. 대조적으로, 헥산 및 냉압착 추출은 모두 오일을 산소에 노출시켜 과산화물 라디칼을 축적시킨다. 열분해의 관점에서, 산소종의 축적은 헥산 추출 및 냉압착된 오일에서 보여지는 느린 분해를 초래할 수 있다. 게다가, 후자의 기술은 선택적이지 않으며, 추출된 원유(crude oils)는 인지질, 복합 금속, 복합 미네랄, 지방산 및 다른 극성 화합물을 포함하는 광범위한 불순물이 포함될 수 있다. SCO는 불순물이 적을 수 있으므로, 분해의 초기 온도 값이 낮아진다.

[0192] 도 5(c)를 참조하면, 추출된 오일 및 스쿠알렌 표준물질의 FT-IR 스펙트럼은 중적외선 영역 ($4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$)에서 기록되었다. 스쿠알렌은 각각 2968.87 및 2920.66 cm^{-1} 에서 $-\text{CH}_3$ 및 $-\text{CH}_2$ 의 비대칭 신축 진동을 나타내었고, 2857.99 cm^{-1} 에서 비대칭 $-\text{CH}_2$ 의 신축 진동을 나타내었다. 이러한 흡수 밴드는 메틸렌($-\text{CH}_2$) 기 모두에 대해 더 강한 강도를 가진 모든 오일에서 감지되었으며, 이는 대부분 다양한 지방산에 이러한 기가 존재하기 때문일 수 있다. 스쿠알렌의 1666.19 cm^{-1} 에서의 흡수 밴드는 약한 $-\text{C}=\text{C}-$ 신축 진동과 관련이 있다. 1742 cm^{-1} 에서 관찰된 대구 간유의 진동 밴드는 추출된 오일의 다양한 지방산의 카보닐 기(카르복실산 말단 기)의 $-\text{C}=\text{O}$ 신축 진동과 관련이 있다. 지문 영역에서, 1445.4 및 1381 cm^{-1} 에서 스쿠알렌 진동 밴드는 $-\text{CH}_2$ 가위 및 $-\text{C}(\text{CH}_3)$ 대칭 굽힘과 관련이 있고, 이는 약하지만 추출된 대구 간유에서도 감지되어 스쿠알렌의 존재를 확인할 수 있다.

[0194] <실험예 7> 오일의 *In-vitro* 생물학적 활성

[0195] 7-1. 항산화 활성 분석

[0196] 대구 간유(CLO)의 항산화 활성은 3가지 항산화 분석, 즉 ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) 및 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) 분석을 사용하여 분석되었고, 이전 보고된 방법에 약간의 수정을 가하였다 (Nkurunziza, Pendleton, Sivagnanam, Park, & Chun, 2019), (Bordoni, Fedeli, Nasuti, Maggi, Papa, Wabitsch, et al., 2019). 결과는 오일 밀리리터 당 밀리그램 Trolox 등가로 표시되었다 (mgTE/mL, oil).

[0198] 도 6 (a) 내지 (c)를 참조하면, (a) DPPH 및 (c) FRAP 분석에 의해 평가된 HCO 및 SCO 라디칼 소거 및 환원력 활성 사이에는 차이가 없었다. 이는 추출된 오일의 강력한 천연 항산화제인 스쿠알렌의 농도가 비슷하기 때문일 수 있다. 게다가, CCO에서의 스쿠알렌의 양은 SCO 및 HCO의 농도보다 각각 10배 및 8배 낮은 것으로 나타났다 (표 6). 결과적으로, CCO의 항산화 활성은 HCO 및 SCO의 활성보다 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$).

[0200] 7-2. 세포 배양 및 세포 생존율 분석

[0201] 세포에 대한 독성을 확인하기 위해, 추출된 오일을 DMSO로 희석하였다. 세포는 37℃, 95% 습도 및 5% CO_2 의 포

준 대기 조건 하에서 배양되었다.

- [0202] 인간 위선암(human gastric adenocarcinoma) AGS 세포주를 10% 열-비활성화 소태아 혈청 (Gibco, Grand Island, NY, USA), 100 U/mL 페니실린 및 10 µg/mL 스트렙토마이신 (Hyclone, Logan UT, USA)이 보충된 Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640, GIBCO, Grand Island, New York, USA)에서 배양시켰다.
- [0203] AGS 세포는 계대 4까지 85% confluency로 배양한 후, 세포를 96-웰 플레이트에 접종하고 부착되도록 하였다. 24 시간 후에 배지를 제거하고 새로운 배지에서 다양한 방법으로 추출된 다양한 농도의 CLO를 세포에 처리하여 24 시간 동안 항암 활성을 확인하였다.
- [0204] 그 후, 배지를 신선한 RPMI 배지로 교체하고, 제조사의 지시에 따라 각 웰에 10 µL의 EZ-Cytox (WST-1; Daeil Lab Service, Seoul, Republic of Korea) 용액을 첨가하여 세포에 처리하였다. 플레이트는 37°C에서 2시간 동안 암실에서 배양한 다음, ELISA microplate reader에서 중간 속도로 5초 동안 진탕시켰다. 460 nm에서 광학 밀도를 측정하고 생존 세포를 정량화하는 데 사용하였다. 처리된 세포의 생존율을 그래프에 표시하였다.
- [0206] 인간 위선암 세포주 (AGS)의 세포 생존율을 테스트하여 오일의 항암 능력을 평가한 결과, 도 6(d)에 나타난 바와 같이, CCO는 약 800 µg/mL의 IC₅₀ 값으로, AGS에 대해 현저히 낮은 효능을 나타내었다. IC₅₀ 값은 HCO (약 600 µg/mL)로 세포를 처리한 후 현저히 감소되었고, 이는 아마도 더 많은 양의 스쿠알렌, 비타민 D 및 비타민 K 때문일 수 있다. AGS 세포는 SC-CO₂ 추출된 오일 (SCO)에 매우 민감하였으며, SC-CO₂ 추출된 스쿠알렌, 비타민 D 및 비타민 K의 함량이 가장 높기 때문에 90 µg/mL의 현저히 더 낮은 IC₅₀ 값을 나타내었다.
- [0208] 7-3. 항균 활성 분석
- [0209] 대구 간유(CLO)의 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 살균 농도(minimum bactericidal concentration, MBC)는 *Bacillus cereus* 및 *Escherichia coli*를 사용하여 미세희석법으로 평가하였다.
- [0210] 간략하게, CLO는 96-웰 플레이트에서 10% 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에서 1000에서 1.95 µg/mL의 다양한 농도로 연속 희석되었다. 먼저, 100 µL의 Mueller Hinton broth를 최대 11개의 웰에 추가한 다음, 100 µL의 희석된 CLO를 첫번째 웰에 첨가하고 완전히 혼합하였다. 그 후, 100 µL의 희석된 샘플을 다음 웰에 옮기고 완전히 혼합하였다. 이 단계를 마지막 웰까지 반복하였다. 오일을 점진적으로 희석한 후, 5 µL의 박테리아 배양액 및 5 µL의 레사주린(resazurin)을 2개의 다른 열에 있는 웰에 첨가하고 완전히 혼합한 다음, 플레이트를 37°C에서 24시간 동안 배양하였다.
- [0211] 이 절차는 수동 압착 방법을 이용한 대구 간유 추출(CCO), 헥산 용매 방법을 이용한 대구 간유 추출(HCO), 및 초임계 이산화탄소 방법을 이용한 대구 간유 추출(SCO)에 적용되었다. MIC는 과란색에서 분홍색의 범위 색상을 기준으로 결정되었다. MBC를 결정하기 위해, 10 µL의 반응 혼합물을 멸균 한천 플레이트에 옮겨 37°C에서 24시간 동안 배양하였다.
- [0213] 하기 표 7은 *E.coli* 및 *B. cereus*에 대한 대구 간유의 최소 억제 농도(MIC) 및 최소 살균 농도(MBC)를 나타낸 것이다.

표 7

Materials	Bacterium			
	<i>E. coli</i>		<i>B.cereus</i>	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)
CCO	125	250	250	500
HCO	125	250	250	500
SCO	125	250	250	500

[0214]

[0215]

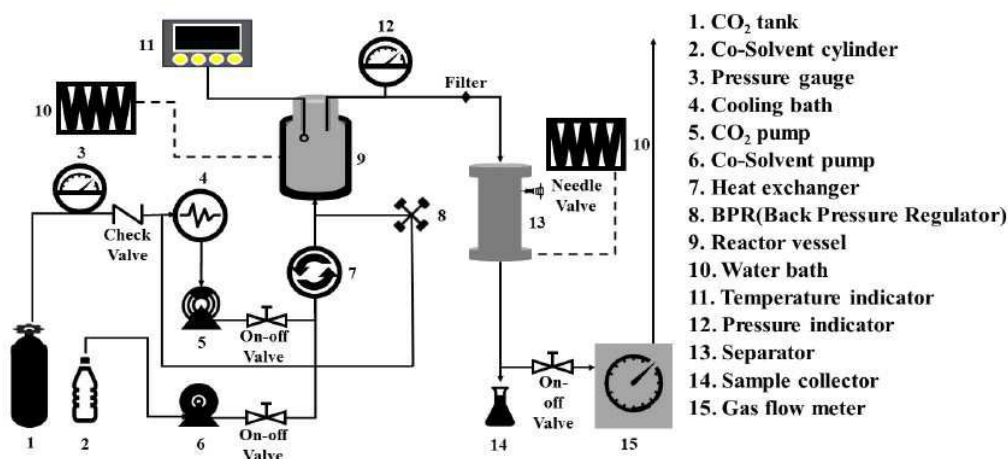
상기 표 7을 참조하면, 그람 음성의 *E. coli*는 MIC 및 MBC가 각각 $125 \mu\text{g/mL}$ 및 $250 \mu\text{g/mL}$ 로 가장 낮게 나타나 대구 간유에 가장 민감하였다. 그러나, 이러한 값은 그람 양성인 *B. cereus*의 경우 MIC 및 MBC가 각각 $250 \mu\text{g/mL}$ 및 $500 \mu\text{g/mL}$ 로 *E. coli*의 두 배의 값으로 나타났다. 대부분의 항균제가 복잡한 세포벽 구조로 인해 그람 음성 종에 대해 쉽게 적용할 수 없는 점에서 이는 놀라운 발견이다. 대구 간의 높은 스쿠알렌 함량은 *E. coli*에 대해 우수한 항균 활성의 원인이 될 수 있다.

[0217]

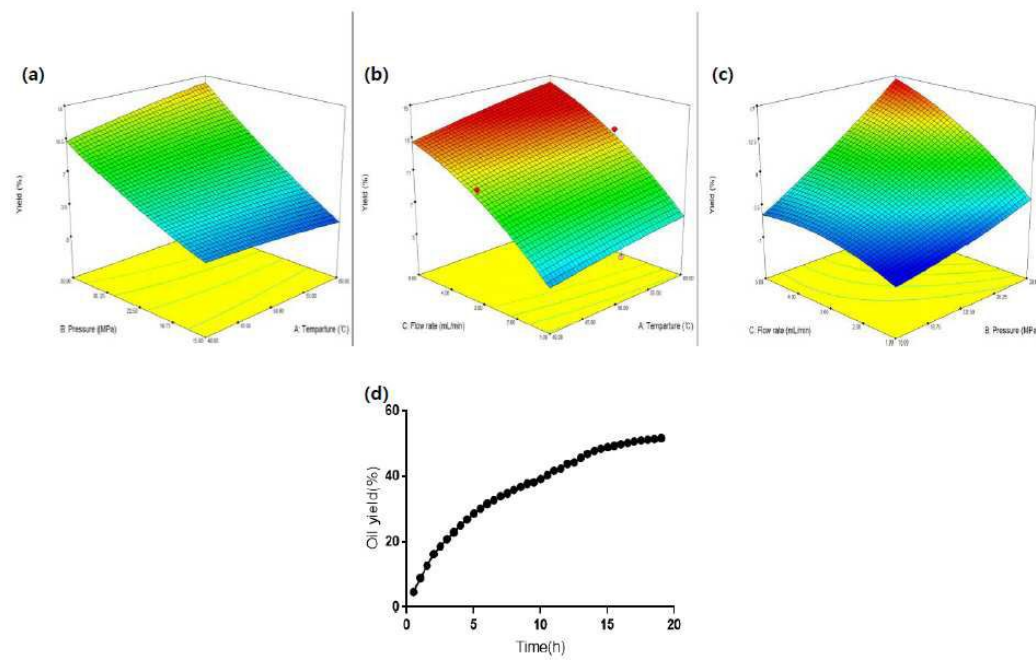
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

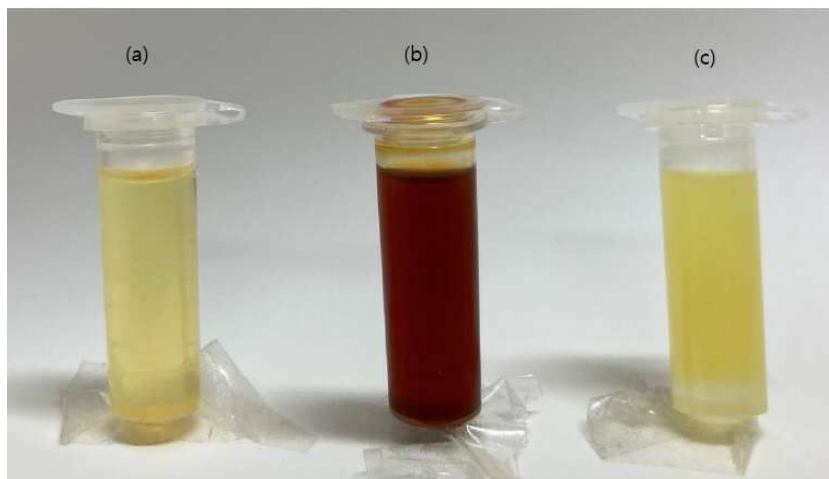
도면1



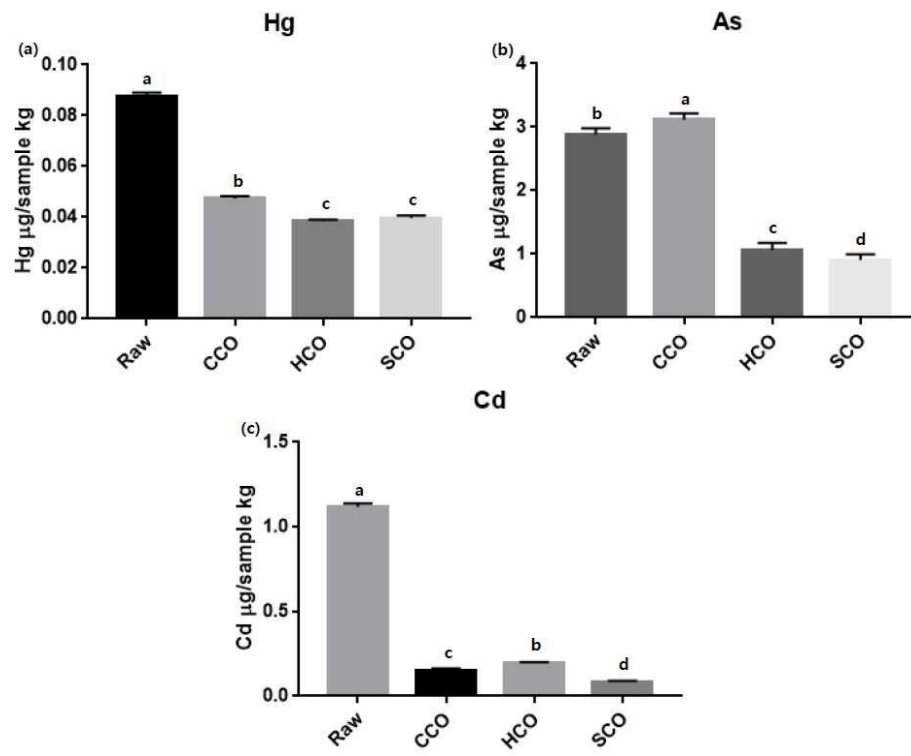
도면2



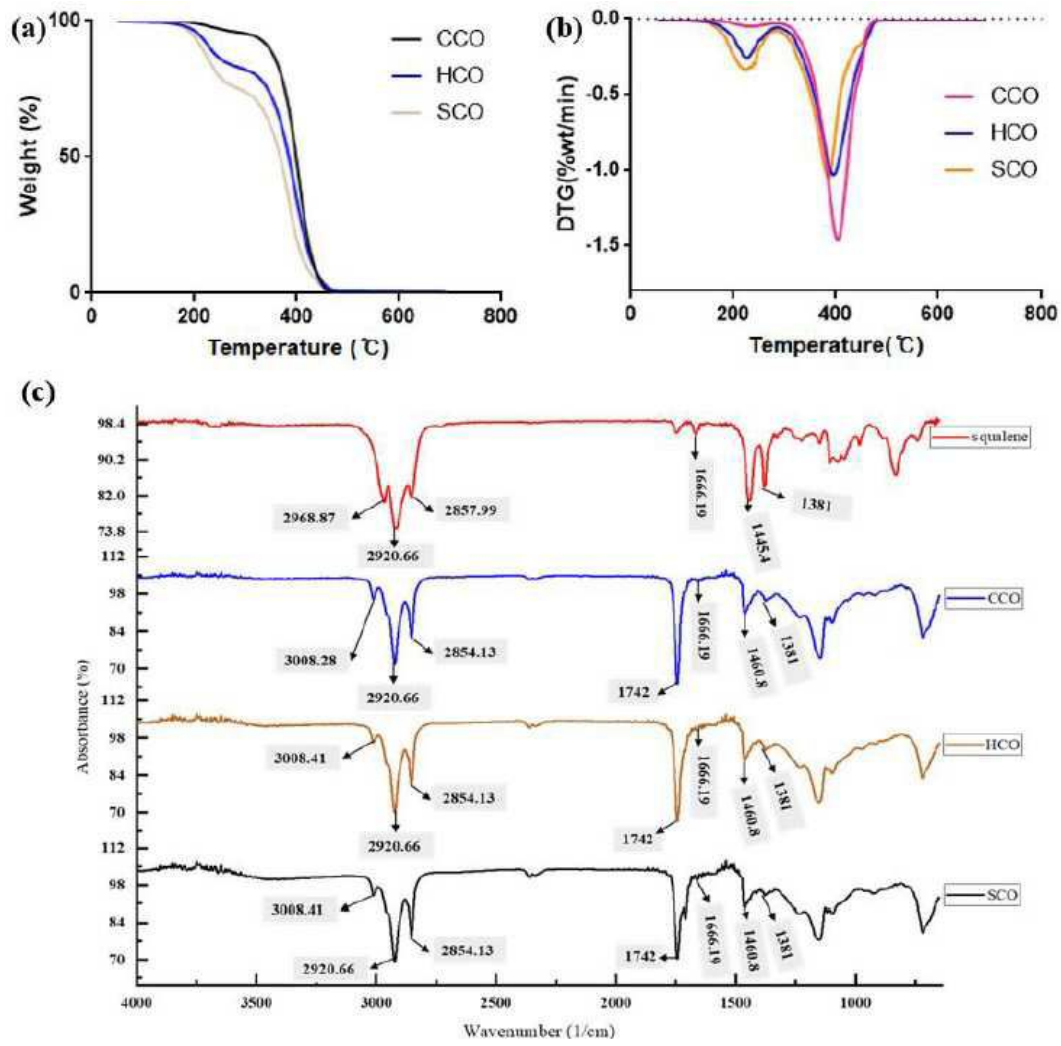
도면3



도면4



도면5



도면6

